

黑曲霉 N14 植酸酶基因在巴斯德毕赤酵母中的高效表达

彭远义^{1,2*} 刘生峰² 李春明² 周泽扬^{1*}

¹(西南农业大学重庆市蚕桑学重点实验室微生物中心,重庆 400716)

²(西南农业大学动物科技学院重庆市牧草与草食家畜重点实验室,重庆 400716)

摘 要 从黑曲霉 N14 基因组 DNA 中扩增出植酸酶 *phyA* 基因表达片段,并将其克隆到 pMD18-T 载体中。以此片段构建了 pPIC9K-*phyA* 重组表达载体,目的片段以正确的阅读框架插入到 pPIC9K 的多克隆位点 *EcoR* I 和 *Not* I 之间。重组表达载体经 *Xba* I 线性化处理,电击转化毕赤酵母,经 G418 抗性筛选、酶活性测定、PCR 鉴定和 SDS-PAGE 分析,获得了两株产酶活性分别为 143 958.3u/mL 发酵液(PP-N14-22)和 148 908.3u/mL 发酵液(PP-N14-44)的高产工程菌,其酶活性分别是出发菌株酶活性(422u/mL)的 341.13 倍和 352.86 倍,重组酵母具有很好的遗传稳定性。重组植酸酶在 pH 值 2.5~3.0 和 5.0~5.5 时酶活性最高,且在 pH4.5~6.5 之间均有相当高的酶活性,最适作用温度为 55℃。

关键词 黑曲霉 N14, 植酸酶, *phyA* 基因, 毕赤酵母

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0967-05

植酸酶可催化植酸及植酸盐水解成肌醇和无机磷酸盐,目前主要用于饲料工业和食品工业,以消除植物性饲料(或食品)中植酸的抗营养作用,提高机体对蛋白质及多种微量元素利用率,促进生长发育,提高动物生产性能,减少粪便中磷的排放量,降低磷对环境的污染^[1-3]。

植酸酶主要存在于植物和微生物中,其中以微生物产生的植酸酶具有良好的开发前景,但微生物天然菌株产酶水平较低,难以在生产中推广应用。利用分子生物学技术构建基因工程菌,以提高植酸酶产量,从而降低生产成本,已成为世界性的研究热点之一^[4-9]。本试验以自行筛选并进一步通过诱变选育获得的植酸酶高产突变菌株黑曲霉 N14 为出发菌株,以 pPIC9k 为表达载体,经 *Xba* I 线性化处理,使来源于黑曲霉 N14 的植酸酶基因在毕赤酵母中获得了高效表达。

1 材料与方 法

1.1 材 料

黑曲霉 N14(由本实验室自行选育的植酸酶产生菌突变株),*Pyrobest* DNA 聚合酶、*EcoR* I、*Not* I、*Xba* I、pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司,DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司,植酸钠(P3168)、lyticase 购自 Sigma 公司,毕赤酵母 GS115(His-Mut⁺)、质粒 pPIC9K 为 Invitrogen 公司产品,T4 DNA 连接酶、Taqase 为 Promega 公司产品,质粒 DNA 抽提试剂盒购自上海申友生物工程公司,*E. coli* DH5 α 由西南农业

大学蚕桑学重点实验室保存。

1.2 黑曲霉 N14 基因组 DNA 的提取

将黑曲霉 N14 菌种接种于马铃薯固体培养基,28℃ 培养 48h,转入马铃薯液体培养基中,28℃ 摇床培养至长出大量菌丝。收集菌丝体,采用张莉莉等^[10]报道氯化苜法略加改进后提取其基因组 DNA。紫外分光光度计和凝胶电泳检测抽提效果。

1.3 黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因表达片段的克隆及鉴定

根据黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因全序列(GenBank 注册号为 AY426977)并参照姚斌^[4]和王红宁等^[5]的报道,从信号肽下游开始设计一对引物,以扩增去除信号肽和内含子序列的全长 *phyA* 结构基因。同时为后续工作的方便,上游引物引入 *EcoR* I 酶切位点、下游引物引入 *Not* I 酶切位点(上游引物 5' *gaattctggcagtcctccgctcgag* 3',下游引物 5' *ggggccgctaagcaaaacactcc* 3')。试剂盒回收扩增产物,经加 A 处理后,与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,抽提质粒 DNA,进行电泳检测、酶切鉴定和 PCR 鉴定^[11]。

1.4 重组酵母表达载体的构建

用 *EcoR* I 和 *Not* I 分别双酶切上述阳性克隆菌株质粒 DNA 和 pPIC9K 质粒 DNA,凝胶电泳回收日的条带,按照分子克隆手册^[11]进行表达片段的连接、转化和阳性克隆的筛选。抽提重组质粒 DNA,进行电泳检测、酶切鉴定、PCR 鉴定和测序分析。

收稿日期:2004-04-01,修回日期:2004-06-10。

基金项目:重庆市科委攻关项目(No. 20016755)基金资助。

* 通讯作者。 Tel: 86-23-68250959; Fax: 86-23-68251196; E-mail: ppy2002@sina.com

1.5 酵母的电击转化

将重组表达载体 pPIC9K-*phyA* 质粒 DNA 经内切酶 *Xba*I 线性化处理,参照贝锦龙等^[6]方法电击转化毕赤酵母 GS115。电击结束后立即加入 1mL 预冷的 1mol/L 山梨醇,3000r/min 离心 5min,菌体重悬于 400 μ L 预冷的 1mol/L 山梨醇中,取 200 μ L 涂布于 MD 平板(1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素,2% 葡萄糖,2% 琼脂糖)上,30 $^{\circ}$ C 培养至菌落出现。随机挑取菌落点种到含不同浓度 G418(0,0.25mg/mL,0.50mg/mL,0.75mg/mL,1.00mg/mL,1.50mg/mL,1.75mg/mL,2.00mg/mL,3.00mg/mL,4.00mg/mL)的 YPD 平板上,30 $^{\circ}$ C 培养 2~5d,每天检查菌落生长情况。筛选生长快速且 G418 抗性较高的阳性克隆。

1.6 重组酵母的 PCR 鉴定

所用引物参照 pPIC9K 通用引物序列设计,上游引物为:5'gactggtccaattgacaagc 3',下游引物为:5'ggcaaatggcattctgacatcct 3'。酵母基因组 DNA 的提取采用菌落裂解法:取 7 μ L 双蒸水和 3 μ L lyticase(3mg/mL),加入适量菌落混匀,30 $^{\circ}$ C 1h,离心,取上清液作为 DNA 模板。PCR 反应体系(25 μ L):Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 1.5 μ L, dNTP 1 μ L, DNA 2 μ L, Taqase 0.25 μ L,上下游引物各 1 μ L, ddH₂O 15.75 μ L。反应参数为:94 $^{\circ}$ C 5min, (94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min) \times 30, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.7 重组酵母的诱导表达

将重组酵母接种于 10 mL BMGY(1% 酵母提取物,2% 蛋白胨,1.34% YNB, (4×10^{-5})% 生物素,1% 甘油)中,30 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养至 $OD_{600} = 10 \sim 20$,离心收集菌体,加入 10 mL 诱导培养基(用 1% 甲醇代替 BMGY 中的甘油),30 $^{\circ}$ C 下继续诱导培养,每天添加一次甲醇,每隔 12h 进行酶活测定,直到 168h。植酸酶酶活测定法参照文献^[12]报道的钒钼酸铵法进行,酶活单位(u)定义为:在一定条件下,每分钟释放出 1nmol/L 无机磷所需要的酶量为 1u。

1.8 表达产物的 SDS-PAGE 分析及部分酶学性质研究

将诱导表达后的发酵液离心,取上清液进行 SDS-PAGE 分析。酶学性质研究参照文献^[6]进行。

1.9 重组酵母的遗传稳定性研究

在重组酵母生长、诱导表达一个周期后,取 1mL 菌液作为下一轮生长、诱导表达的种子液继续培养,每次测定酶活性,共进行 10 轮。从第 10 轮的菌体中提取基因组 DNA 进行植酸酶基因的 PCR 检测。

1.10 重组酵母植酸酶表达量与诱导培养时间的关系

酵母重组子在诱导表达后,每隔 12h 测定发酵上清液植酸酶活性,绘制发酵液的酶活时间曲线。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因表达片段的克隆及鉴定

根据黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因全序列分析,去除内含子和信号肽后的长度为 1347bp。用高保真 *Pyrobest* DNA 聚合酶扩增出的产物长约 1.4kb(图 1),与预期相符。回收

PCR 扩增产物,克隆到 pMD18-T 载体后,经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切鉴定(图 2)和 PCR 鉴定,均获得了约 1.4kb 的特异性条带,证明已克隆到黑曲霉 N14 植酸酶基因表达片段。

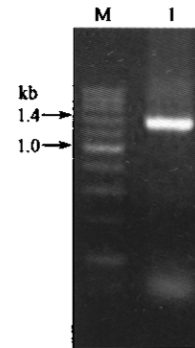


图 1 植酸酶 *phyA* 基因表达片段的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *phyA* gene

M:200bp DNA ladder marker; I:PCR product

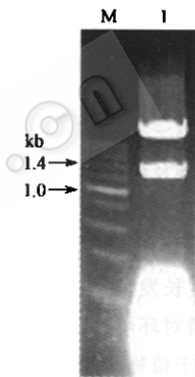


图 2 重组质粒 pMD18-T-*phyA* 的酶切结果

Fig.2 Restriction analysis of recombinant plasmid pMD18-T-*phyA*

M:200bp DNA ladder marker; I:recombinant plasmid/*Eco*R I

2.2 黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因表达载体的构建及鉴定

构建含有植酸酶 *phyA* 基因表达片段的重组表达载体 pPIC9K-*phyA*(图 3)。重组质粒经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切鉴定(图 4)和 PCR 检测,均得到约 1.4kb 的产物,表明 pPIC9K-*phyA* 构建成功。

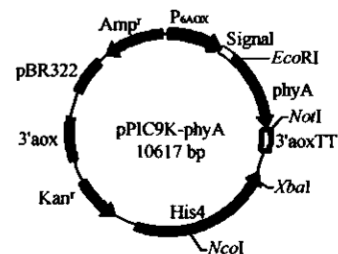


图 3 重组表达载体 pPIC9K-*phyA* 的物理图谱

Fig.3 Physical map of recombinant plasmid pPIC9K-*phyA*

2.3 黑曲霉 N14 植酸酶基因重组表达载体的测序分析

测序结果与黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因全序列比较分析表明,表达片段完整,全长 1347bp,起始于黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因信号肽后的第 20 位氨基酸的碱基,终止于终止子,该片段除了不含有信号肽和内含子序列以外,其它部位

与黑曲霉 N14 植酸酶 *phyA* 基因序列一致。表达片段以正确的阅读框架插入到 pPIC9K 的多克隆位点 *EcoR* I 和 *Not* I 之间。

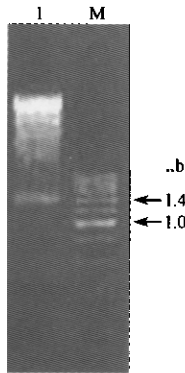


图4 重组表达载体 pPIC9K-*phyA* 的酶切结果

Fig.4 Restriction analysis of recombinant plasmid pPIC9K-*phyA*

M:200bp DNA ladder marker; 1: recombinant plasmid/*EcoR* I + *Not* I

2.4 酵母的电击转化与筛选

将 *Xba* I 线性化处理的 pPIC9K-*phyA* 重组质粒经电击法转化入毕赤酵母 GS115 菌株,通过 MD 平板和 G418 抗性筛选,得到重组转化子 98 个。进一步通过诱导培养和酶活性测定(37℃、pH5.5 条件下反应 1h),筛选到两株产酶活性分别为 143958.3u/mL 发酵液(PP-N14-22)和 148908.3u/mL 发酵液(PP-N14-44)的高产工程菌株,其酶活性分别是出发菌株酶活性(422u/mL)的 341.13 倍和 352.86 倍。

2.5 重组酵母的 PCR 鉴定

采用菌落裂解法提取酵母基因组 DNA,用 pPIC9K 通用引物进行 PCR 扩增,得到一条约 1.8kb(含目的基因 1347bp 和载体序列 492bp)和一条约 2.2kb(本研究得到的转化子为甲醇利用型,2.2kb 为 AOX1-酒精氧化酶 1 基因)的电泳带(图 5),证明重组表达载体已成功整合入酵母基因组 DNA 中。

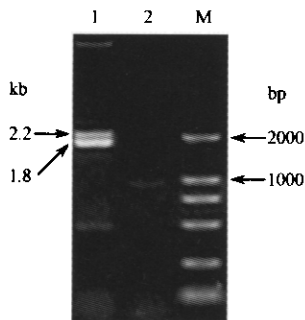


图5 重组子的 PCR 鉴定

Fig.5 Identification of GS115 transformed with pPIC9K-*phyA* by PCR
M: DNA marker DL2000; 1:GS115 transformed with pPIC9K-*phyA*; 2: GS115

2.6 表达产物的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 结果显示(图 6),重组酵母能有效分泌表达植酸酶,表达产物分子量介于 70kD ~ 97kD 之间,且带形较宽,这可能与其表达产物糖基化程度的不均一性有关。另外,发

酵液中除植酸酶蛋白外,在电泳图中几乎看不到杂蛋白。不同线性化方式对植酸酶表达量有一定影响(2,3 为 *Nco* I 线性化后转化,4,5,6 为 *Xba* I 线性化后转化,详文另述)。

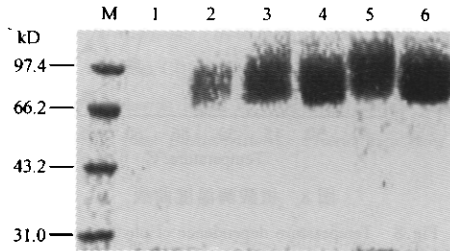


图6 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE of supernatant after methanol induction

M: size marker; 1: GS115; 2,3: GS115 transformed with pPIC9K-*phyA* (after digestion with *Nco* I); 4 ~ 6: GS115 transformed with pPIC9K-*phyA* (after digestion with *Xba* I)

2.7 表达产物植酸酶部分酶学性质

实验结果表明,重组酵母表达的植酸酶最适作用 pH 值有两个(37℃条件下反应 1h),分别为 2.5 ~ 3.0 和 5.0 ~ 5.5, pH5.5 时峰值最高(约为 pH2.5 的 172%),pH2.5 与 pH3.0 峰值相当,pH5.0 与 pH5.5 峰值相当,在 pH4.5 ~ 6.5 之间均有相当高的酶活性,pH4.0 峰值约为 pH5.5 的 41%,pH7.0 时酶活性急剧下降,而出发菌株最适作用 pH 值仅为 1.5 和 2.5 (图 7),说明重组酵母表达的植酸酶适应范围得到显著拓宽。在 pH5.5、不同温度条件下的酶活性测定结果表明,重组酵母表达的植酸酶最适作用温度为 55℃,出发菌株为 50℃,二者在 50℃ ~ 55℃ 之间均有较高的酶活性,重组酵母在 60℃ 时仍然保持较高的酶活性(相对酶活性 78.22%),而出发菌株在 60℃ 时酶活性急剧下降(相对酶活性 24.47%),说明工程菌的植酸酶温度适应范围有所提高(图 8)。

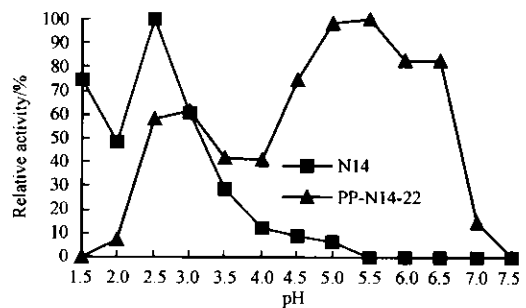


图7 植酸酶 pH 曲线

Fig.7 pH dependence of phytase activity

2.8 重组酵母的遗传稳定性

重组酵母经连续 10 次培养和诱导表达,在生长密度及植酸酶的活性方面基本保持稳定。PCR 检测结果也证明,经过 10 轮的连续培养,外源基因仍然整合在酵母基因组中,证明转化子具有良好的遗传稳定性。

2.9 重组酵母植酸酶表达量与诱导培养时间的关系

对重组酵母 PP-N14-22 诱导培养时间与植酸酶表达量的关系研究表明(图 9),在诱导培养 168h 之内,植酸酶的表达随时间的延长而增加,到 144h 接近高峰,之后基本保持稳

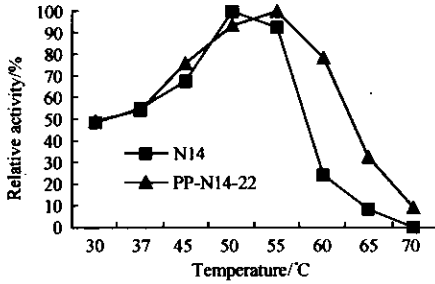


图8 植酸酶温度曲线

Fig. 8 Temperature dependence of phytase activity

定。重组子为甲醇利用型,菌体湿重在诱导培养 72h 之内有所增加,随后基本保持稳定。

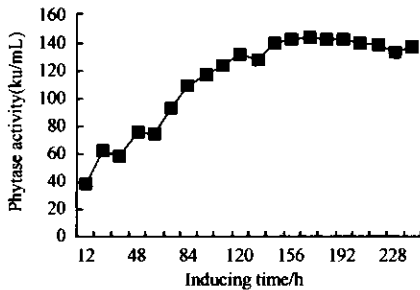


图9 植酸酶诱导表达的时间曲线

Fig. 9 Time course curve of phytase activity induced by methanol

3 讨论

目前用于提取真菌 DNA 的方法主要有 CTAB 法^[13]和氯化苜法^[10]。张莉莉等^[10]认为采用氯化苜法提取真菌 DNA 时,可以省略蛋白质抽提过程,但我们在实验中发现,若不采用酚氯仿抽提,蛋白质过多,为此我们增加了酚氯仿抽提过程,并在抽提前先进行 RNase 消化,以便采用酚氯仿抽提时将 RNase 一并除去,以节省时间。

毕赤酵母表达系统具有表达量高、能进行蛋白质翻译后修饰、容易大规模生产、生产成本低、外源蛋白基因遗传稳定性较好等特点,目前国内外已有数百种外源蛋白基因在毕赤酵母中获得表达,利用毕赤酵母表达微生物植酸酶也越来越受到人们的重视。Yanming 等^[9]将植酸酶基因连接到 pPIC-ZaA 载体,转化毕赤酵母后获得了高效表达。贝锦龙等^[11]将人工合成的黑曲霉 NRRL3135 植酸酶基因与 pPICZaA 载体连接,在毕赤酵母 X-33 菌株中获得高效表达。姚斌等^[4]将改造后的来源于黑曲霉 963 的植酸酶基因与 pPIC9 载体连接,转化毕赤酵母 GS115 后获得了高效表达,表达量约为 15000u/mL 发酵液。但以上试验所采用的载体难以获得高拷贝数的插入片段。王红宁等^[5]将黑曲霉 N25 植酸酶基因与 pPIC9K 载体连接,转化毕赤酵母 GS115 后获得了含高拷贝数外源基因的重组酵母菌,植酸酶表达量最高达到 35646.7u/mL 发酵液,但对表达载体的线性化方式与姚斌等^[4]报道相同,都是采用 Bgl II 线性化处理,表达载体整合在染色体的 AOX1 座位,所产生的转化子表型为 His⁺ Mut⁻ (不利用甲醇)。有试验表明,表达单元的不同整合方式、拷贝数等对获

得高表达菌株具有重要意义^[14]。本试验将黑曲霉 N14 植酸酶基因表达片段与多拷贝表达载体 pPIC9K 连接,采用 Xba I 线性化处理的 pPIC9K-phyA 重组载体整合在毕赤酵母 GS115 菌株染色体的 His4 位置,所产生的转化子表型为 His⁺ Mut⁺ (能利用甲醇),在密码子未经优化的条件下,植酸酶基因表达水平与贝锦龙等^[11]报道结果相当,显著高于 Yanming 等^[9]、姚斌等^[4]和王红宁等^[5]的报道,基本达到工业化生产的要求,且本研所得到的转化子为甲醇利用型,有利于发酵工艺的简化。采用 Xba I 线性化处理 pPIC9K-phyA 重组表达载体,国内外尚未见报道,本研究结果表明,该方法切实可行,并能得到表达量高的重组转化子。

单胃动物胃中 pH 值为 1.5~3.5,肠道 pH 值为 5.0~7.0,植酸酶作为饲料添加剂使用时,要求植酸酶在酸性条件下必须有较高的酶活性。重组酵母表达的植酸酶酶学性质初步研究表明,重组植酸酶最适作用 pH 值分别为 2.5~3.0 和 5.0~5.5,并且在 pH4.5~6.5 之间均有相当高的酶活性,与出发菌株相比植酸酶 pH 适应范围得到显著拓宽,最适作用温度也有所提高。以上酶学性质的改变可能是因为酵母细胞蛋白质合成加工的内环境与黑曲霉存在一定的差异所致,如糖基化位点的识别、所连接的糖链、分泌途径的差异等。本研究结果提示,重组酵母植酸酶能更好地满足生产的需要。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hurrell RF, Reddy MB, Juillerat MA *et al.* Degradation of phytic acid in cereal porridges improves iron absorption by human subjects. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77(5):1213-1219
- [2] Lim HS, Namkung H, Paik IK. Effects of phytase supplementation on the performance, egg quality, and phosphorous excretion of laying hens fed different levels of dietary calcium and nonphytate phosphorous. *Poult Sci*, 2003, 82(1):92-99
- [3] Lei XG, Stahl CH. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(4):474-481
- [4] Yao B (姚斌), Zhang CY (张春义), Wang JH (王建华) *et al.* High-level expression of bioactive phytase in *Pichia pastoris* yeast. *Science in China (Series C) (中国科学 C 辑)*, 1998, 28(3):237-243
- [5] Wang HN (王红宁), Ma MG (马孟根), Wu Q (吴琦) *et al.* Over-expression research of *Aspergillus niger* N25 phytase gene (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Mycosystema (菌物系统)*, 2001, 20(4):486-493
- [6] Bei JL (贝锦龙), Chen Z (陈庄), Yang L (杨林) *et al.* Over-expression of artificial synthetic gene of *Aspergillus niger* NRRL3135 phytase in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2001, 17(3):254-258
- [7] Eric R, Edward JM, Xin GL. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268(2):373-378

- [8] Yanming H, David BW, Xin GL. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 1999, 65(5):1915 - 1918
- [9] Yanming H, Xin GL. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 364(1):83 - 90
- [10] Zhang LL (张莉莉), Zhang LH (张苓花), Shi JF (史剑斐) *et al*. Isolation and molecular biological analyses of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride. *J Dalian Institute of Light Industry* (大连轻工业学院学报), 2000, 19(1):45 - 47
- [11] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)
- [12] Zhuang RH (张若寒). Determination methods of phytase activity. *Feed in China* (中国饲料), 1997, 5:30 - 32
- [13] Wu ZH (吴志红), Wang TH (汪天虹), Huang W (黄卫) *et al*. A simplified method for chromosome DNA preparation from filamentous fungi. *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 20(4):575 - 577
- [14] Vassileva A, Arora CD, Swaminathan S *et al*. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*. 2001, 21(1):71 - 80

Over-expression of *Aspergillus niger* N14 Phytase Gene in *Pichia pastoris*

PENG Yuan-Yi^{1,2*} LIU Sheng-Feng² LI Chun-Ming² ZHOU Ze-Yang^{1*}

¹(Microbiology Center, Chongqing key laboratory of Sericulture, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

²(Chongqing key laboratory of Forage & Herbivore, College of Animal Science & Technology, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract The chromosomal DNA was extracted from *Aspergillus niger* N14 strain by benzyl chloride. A pair of primers were designed and synthesized according to the full sequence of the *phyA* gene (GenBank Accession No. AY426977) and used to amplify the 1.4kb gene using the high-fidelity DNA polymerase Pyrobest. The amplified fragment was cloned into pMD18-T to generate the recombinant expression vector pPIC9K-*phyA* containing the phytase encoding gene free of the signal peptide and intron sequence. Linearized by *Xba* I restriction enzyme, the recombinant plasmid pPIC9K-*phyA* was transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. Two recombinant strains, named PP-N14-22 and PP-N14-44, of high level of expression producing phytase of 143 958.3u/mL and 148 908.3u/mL respectively under shake cultivation, were identified by G418 resistance, enzyme activity test, PCR verification and SDS-PAGE analysis. The enzyme activity was 341.13 times and 352.86 times higher than that of the original strain (422u/mL). The recombinant yeast strains were genetically stable. The expressed phytases had two pH optima (2.5 ~ 3.0 and 5.0 ~ 5.5) and a temperature optimum of 55°C, and were active at pH ranged from 4.5 to 6.0.

Key words *Aspergillus niger* N14, phytase, *phyA* gene, *Pichia pastoris*

Received: 04-01-2004

This work was supported by Grant from the Science and Technology Committee of Chongqing Municipality (No.20016755).

* Corresponding author. Tel:86-23-68250959; Fax: 86-23-68251196; E-mail: ppy2002@sina.com